

quotient ist weiterhin die Frage zu diskutieren, ob diese Abweichungen durch einen dritten unbekannten Faktor bei urämischen Patienten hervorgerufen werden (22). Diese Möglichkeit läßt sich durch unsere Befunde nicht sicher ausschließen, obgleich die oben aufgeführten experimentellen Untersuchungen eher daran denken lassen, daß die Änderungen des Natrium- und Kaliumquotienten durch den pH-Wert beeinflusst werden.

Für die Behandlung der chronischen Niereninsuffizienz bzw. Urämie ergibt sich aus unseren Befunden, daß durch Einsatz der Hämodialyse sowohl Veränderungen des Säure-Basen- als auch des Elektrolythaushaltes behoben werden können. Diese Normalisierung ist wiederum die Voraussetzung dafür, daß weitere folgenschwere Störungen des Zellstoffwechsels vermieden werden bzw. eine normale Organfunktion wiederhergestellt wird.

Literatur

1. GESSLER, U., Verh. Dtsch. Ges. inn. Med. 66, 870 (1960). — 2. GESSLER, U., Klin. Wschr. 39, 232 (1961). — 3. HÄNZE, S., Klin. Wschr. 38, 769 (1960). — 4. RIECKER, G., Klin. Wschr. 35, 1158 (1957). — 5. RIECKER, G., Klin. Wschr. 41, 184 (1963). — 6. BURCK, H. C., Zschr. exper. Med. 144, 93 (1967). — 7. WILBRANDT, W., J. Pharmacy Pharmacol. London 11, 65 (1959). — 8. WILBRANDT, W., Klin. Wschr. 41, 138 (1963). — 9. ZUMKLEY, H., Zschr. Kreisl.forsch. 56, 678 (1967). — 10. GLEICHMANN, K., H. v. STUCKRAD und M. ZINDLER, Zschr. exper. Med. 139, 255 (1965). — 11. SOMMERKAMP, H. und K. BOMKE, Klin. Wschr. 42, 392 (1964). — 12. ZUMKLEY, H. und H. LOSSE, Gastroenterologia Basel 104, 136 (1965). — 13. LOSSE, H., H. WEHMEYER und F. WESSELS, Klin. Wschr. 38, 393 (1960). — 14. LOSSE, H., H. ZUMKLEY und H. WEHMEYER, Zschr. Kreisl.forsch. 51, 752 (1962). — 15. BRESCIANI, F., F. AURICCHIO und C. FIORE: Nature, London 196, 186 (1962). — 16. KONSEK, I. und C. BISHOP, Proc. Soc. exp. Biol. Med. N.Y. 110, 813 (1962). — 17. WILBRANDT, W., Med. Klin. 50, 2085 (1962). — 18. GESSLER, U. und W. CALIEBE, Zschr. exper. Med. 134, 139 (1961). — 19. GESSLER, U., Internist 3, 672 (1962). — 20. SCRIBNER, B. H., K. FREMONT-SMITH und J. M. BURNELL, J. Clin. Invest. 34, 1276 (1955). — 21. BUBNOFF, v. M. und G. RIECKER, Klin. Wschr. 39, 724 (1961). — 22. SARRE, H., U. GESSLER und V. HEINZE, Internist 10, 446 (1965).

Dr. H. Zumkley
44 Münster (Westf.)
Westring 3

Eine bewährte Methode zur routinemäßigen Bestimmung des proteingebundenen Jods (PBI)

Von A. UETTWILLER

*Aus den Laboratorien (Leiter: Dr. M. Keller) der Universitäts-Frauenklinik Basel
(Direktor: Prof. Dr. Th. Koller)*

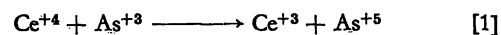
(Eingegangen am 17. Dezember 1967)

Es wird eine zuverlässige Routinemethode zur Bestimmung von PBI im Blutplasma beschrieben. Die oxydative Aufschlußzeit konnte wesentlich verkürzt werden. Eine Vereinfachung der Meßbedingungen wurde durch Unterbrechung der katalytischen Wirkung des Jods auf die Reaktion: $Ce^{4+} \longrightarrow Ce^{3+}$ mittels Zusatz von Hg^{2+} -Ionen erreicht.

A reliable, routine method is described for the measurement of PBI in blood plasma. The time for oxidative cleavage was greatly reduced. The determination was simplified by adding Hg^{2+} ions, which stop the catalytic action of the iodine in the reaction: $Ce^{4+} \longrightarrow Ce^{3+}$.

Es wird im folgenden eine Methode zur PBI-Bestimmung im Blutplasma beschrieben, die sowohl als Makro- (1 ml Plasma) als auch Semimikro- (200 μ l)-Methode in unserem Laboratorium seit einiger Zeit Anwendung findet. Das Verfahren basiert auf den Angaben von FARELL und RICHMOND (1) sowie denjenigen von FRIEDMANN (2), welche die nasse Veraschung von jodhaltigen Proteinen beschrieben.

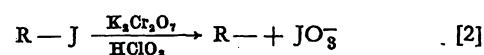
Unsere wichtige Modifikation verkürzt die oxydative Aufschlußzeit von 4½ Stdn. auf 1 Std. Weiter werden die Meßbedingungen wesentlich vereinfacht, indem die katalytische Wirkung von J_2 auf die Reaktion:



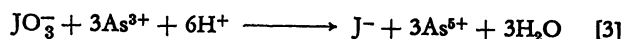
mit Hg^{+2} -Ionen gestoppt wird. Die technischen Schwierigkeiten, welche die meisten bekannten Plasmajodbestimmungsmethoden aufweisen, konnten dadurch weitgehend behoben werden.

Prinzip

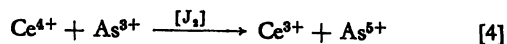
Das mit $HClO_4$ gefällte Eiweiß wird mit einem Chlorsäure-Dichromat-Gemisch oxydativ aufgeschlossen:



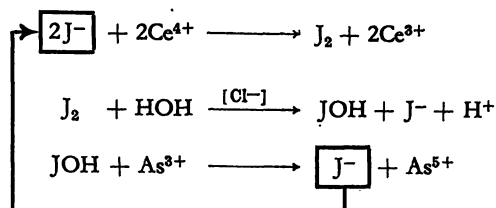
Die Reduktion von JO_3^- mit As^{3+} erfolgt nach:



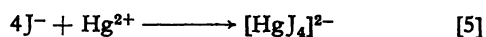
Die Katalyse der Reaktion erfolgt nach:



und kommt vermutlich so zustande:



Die beschleunigte Reduktion von Ce^{4+} zu Ce^{3+} kann nun nach der notwendigen Reaktionszeit¹⁾ durch Zugabe von Hg^{2+} -Ionen unterbrochen werden:



Kinetische Untersuchungen bestätigen in anschaulicher Weise diesen Mechanismus (Abb. 1).

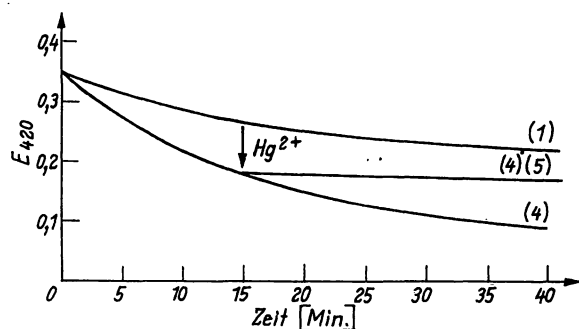
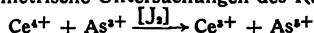


Abb. 1

Spektrophotometrische Untersuchungen des Reaktionsverlaufs



Die Kurven (1) und (4) zeigen die Extinktionsabnahme in Funktion der Zeit (Farbintensitätsabnahme von Ce^{4+} gemessen bei λ (konstant) = 420 nm) der Reaktion [1] und [4] (siehe Text). Die nahezu horizontal verlaufende Kurve (4) (5) zeigt den Einfluß der nach 15 Min. zugesetzten Hg^{2+} -Ionen auf die durch J_2 katalysierte Reaktion.

Methodik

Apparate

Spektrophotometer Unicam SP 600 mit automatischer Durchflußküvette ($d = 1$ cm).

Elektrischer Aluminiumheizblock mit regulierbarer Temperatureinstellung. Zentrifuge (3000 U./Min.) Zentrifugengläser (40 ml Inhalt).

Reagenzien

Bidest. Wasser für sämtliche Lösungen, Verdünnungen und Reagenzien!

Perchlorsäure 1,1N (Merck).

Chlorsäure (HClO_4): 92 g KClO_3 (aus Wasser umkristallisiert) in 250 ml kochendem Wasser lösen. Zur heißen Lösung vorsichtig 75 ml HClO_4 (70–72%) unter stetigem Rühren zugeben. Über Nacht im Kühlschrank stehen lassen und vor Gebrauch schnell durch eine Glasfilternutsche abfiltrieren. Es ist wichtig, daß die Chlorsäure vor dem PBI-Bestimmungstag immer frisch hergestellt werden muß.

¹⁾ Versuche ergaben, daß für einen PBI-Bereich von 0,5–15 $\mu\text{g}/100$ ml eine Reaktionszeit von 15 Min. sehr geeignet ist.

$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -Lösung (10^{-2}M): 2,94 g $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ad 1000 ml Wasser. As^{3+} -Lösung (10^{-1}M): 20 g As_2O_3 in 83 ml 2,5N NaOH lösen. Dann Zugabe von etwa 700 ml Wasser und Zusatz von 83 ml konz. H_2SO_4 . Abkühlen und mit Wasser auf 1000 ml auffüllen. As^{3+} -Lösung (10^{-2}M): 100 ml der 10^{-1}M As^{3+} -Lösung mit 20 ml konz. HCl und anschließend mit 75 ml konz. H_2SO_4 versetzen. Mit Wasser auf 1000 ml auffüllen.

Ce^{4+} -Lösung (0,5M): 14 ml konz. H_2SO_4 werden unter Rühren zu 137 g $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$ gegeben. Zusatz von 50 ml Wasser bis vollständige Lösung erfolgt und auffüllen auf 500 ml mit Wasser. Ce^{4+} -Lösung (10^{-2}M): 10 ml der 0,5M Ce^{4+} -Lösung mit 42 ml konz. H_2SO_4 versetzen. Anschließend mit Wasser auf 500 ml auffüllen.

Hg^{2+} -Lösung (15% W/V): 150 g $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ad 1000 ml 2proz. Essigsäure. Die trübe Lösung wird filtriert.

Sämtliche Gebrauchslösungen werden im Eisschrank aufbewahrt. Sie sind stabil. Die einzige Ausnahme bildet die Chlorsäure, die wie oben schon erwähnt immer frisch zubereitet werden muß. Der angegebene Chlorsäureansatz reicht für 20 Doppelbestimmungen.

Bemerkungen

Die Glasgeräte und die Küvetten müssen durch Einlegen in Chromschwefelsäure gereinigt werden. Nach mehrmaligem Spülen mit Leitungswasser zweimal mit bidest. Wasser nachspülen. Das Veraschen der Proben muß unter einem Abzug erfolgen. Die Bestimmungen werden immer im Doppel ausgeführt. Man teilt die Proben in zwei gleiche Gruppen auf. Mit jeder Gruppe laufen ein Leerwert und zwei Standards mit. Erst nach erfolgter Ablesung der ersten Gruppe wird das Ce^{4+} -Reagenz zu den Proben der zweiten Gruppe gegeben.

Präzision der Methode

Makroverfahren: $n = 50$, $s = \pm 0,18 \mu\text{g}/100$ ml, V. K. = 5,4%.

Semimikroverfahren: $n = 20$, $s = \pm 0,23 \mu\text{g}/100$ ml, V. K. = 7,8%.

Zeitaufwand

In vier Stunden können 20 Doppelanalysen oder 40 Einzelanalysen durchgeführt werden.

ARBEITSVORSCHRIFT: MAKROMETHODE

Reagenzien	Reagenzien-Leerwert	Standard	Analyse
Hylandserum	—	1 ml	—
Plasma	—	—	1 ml
HClO_4 1,1N*	—	10 ml	10 ml

* Die HClO_4 wird tropfenweise unter ständigem Rühren zugegeben. Zentrifugieren, überstehende Lösung dekantieren.

$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (10^{-2}M)	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml
HClO_4	5 ml	5 ml	5 ml

40 Min. bei 125°–130° digerieren (Heizblock vorher auf Temp. stellen). Temp. auf 160° erhöhen. Bei blau-grün-Färbung des Rückstandes 1 Tropfen HClO_4 zugeben und wegnehmen (Reagenzien-leerwert wird dunkelrot). — Abkühlen lassen.

As^{3+} (10^{-2}M)	5 ml	5 ml	5 ml
H_2O -bidest*	7 ml	7 ml	7 ml

* Unter Schütteln zugeben, bis der Rückstand gelöst ist.

Ce^{4+} (10^{-2}M)*	1 ml	1 ml	1 ml
---	------	------	------

* In 15 Sek. Zeitabständen zwischen jeder Probe zugeben. Genau 15 Min. reagieren lassen.

Hg^{2+} 15%*	1 ml	1 ml	1 ml
-----------------------	------	------	------

* In 15 Sek. Zeitabständen zwischen jeder Probe zugeben. Ablesen bei 420 nm gegen H_2O ($d = 1$ cm Küvette).

ARBEITSVORSCHRIFT: SEMIMIKROMETHODE

Reagenzien	Reagenzien-Leerwert	Standard	Analyse
Hylandserum	—	200 μ l	—
Plasma	—	—	200 μ l
HClO ₄ 1,1N*	—	2 ml	2 ml
Zentrifugen und dekantieren.			
K ₂ Cr ₂ O ₇ (10 ⁻³ M)	100 μ l	100 μ l	100 μ l
HClO ₄	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
20 Min. bei 125°—130° digerieren (Heizblock vorher auf Temp. stellen). Temp. auf 160° erhöhen. Bei farblos-blau-Färbung des Rückstandes 20 μ l HClO ₄ zugeben und wegnehmen (Reagenzien-leerwert wird rot). — Abkühlen lassen.			
As ³⁺ (10 ⁻³ M)	500 μ l	500 μ l	500 μ l
H ₂ O bidest*	2 ml	2 ml	2 ml
Rückstand lösen.			
Ce ⁴⁺ (10 ⁻³ M)*	200 μ l	200 μ l	200 μ l
In 15 Sek. Zeitabständen zugeben.			
Hg ²⁺ 15%*	200 μ l	200 μ l	200 μ l

Nach 15 Min. in 15 Sek. Zeitabständen zugeben.
Ablese bei 420 nm gegen H₂O (d = 1 cm Küvette).

* Arbeitsverfahren siehe Makromethode.

Die Auswertung der Resultate erfolgt graphisch. Für jede Meßgruppe wird eine Eichkurve erstellt (Extinktion des Leerwerts und der Standards gegen Äquivalent PBI μ g/100 ml).

Resultate

An Hand von über 1500 PBI-Bestimmungen lassen sich folgende Aussagen machen: Der Mittelwert kann

aus der graphischen Darstellung (Abb. 2) entnommen werden. Er liegt mit großer Wahrscheinlichkeit bei 5 μ g/100 ml. Der deutlich begrenzte Normalbereich liegt zwischen den Werten 3,4 bis 7,2 μ g/100 ml.

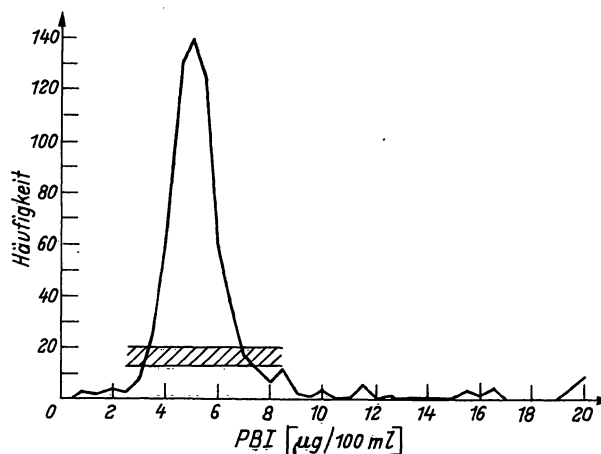


Abb. 2
Werte- und Häufigkeitsverteilung von PBI (1000 Fälle). Mittelwert 5 μ g/100 ml.
Normalbereich 3,4—7,2 μ g/100 ml

Literatur

1. FARELL, L. P. und M. H. RICHMOND, Clin. chim. Acta (Amsterdam) 6, 620 (1961).
2. FRIEDMAN, H. S., Clin. chim. Acta (Amsterdam) 7, 111 (1962).

Dr. A. Uettwiller
CH 4056 Basel, Schweiz
Schanzenstr. 46

BUCHBESPRECHUNGEN

Praktikum der Physiologischen Chemie. Von SIEGMUND-SCHÜTTE-KÖRBER. XVI, 287 Seiten m. 49 Abb. br. DM 19,80.

Verlag Walter de Gruyter & Co., Berlin 1968.

In 6 großen — nach Methoden geordneten — Gruppen ist eine Fülle von Versuchen aufgeführt, die, bei qualitativen Nachweisen beginnend, über die Maßanalytik und Potentiometrie zu optischen und chromatometrischen Methoden führen und schließlich dünn-schichtchromatographische und elektrophoretische Trennungen einschließen. Jeder Art von Versuchen (mit Beschreibung) sind kurze theoretische Erläuterungen vorangestellt, die dort jeweils ausführlicher gehalten sind, wo entsprechende Erklärungen in den meisten Lehrbüchern der Physiologischen Chemie vermißt werden.

Eine Reihe von „Schnelltests“ und enzymatischen Substrat-nachweisen haben viele früher übliche Farbreaktionen verdrängt. So wird auch hier eine größere Anzahl derartiger Verfahren besprochen wohl im Hinblick darauf, daß der weitaus größte Teil der Kursteilnehmer später einmal praktische Medizin betreiben wird.

Im Mittelpunkt steht jedoch die Biochemie der Enzyme: die Erkennung ihrer Eigenschaften, die Bestimmung von Aktivitäten, Konzentrationen usw., wodurch auch an den gut vorgebildeten und biochemisch interessierten Studenten höhere Ansprüche gestellt werden. Dazu sind natürlich z. T. recht aufwendige Versuchsanordnungen notwendig. Hier wird aber durch das am Ende des Buches angegebene Verzeichnis der für die einzelnen Kurstage benötigten Lösungen, Reagenzien und Geräte eine wesentliche Erleichterung zur Vorbereitung des Praktikums gegeben.

Es dürfte wohl unmöglich sein, bei der dem Studenten der Medizin heute für die Physiologische Chemie zur Verfügung stehenden Zeit und den augenblicklich noch sehr großen Studentenzahlen, alle hier angegebenen Versuche durchzuführen. Das ist wohl auch von den Autoren nicht intendiert. Sie schlagen im Vorwort selbst eine gut durchführbare Auswahl vor.

Es ist außerordentlich dankenswert, daß die Autoren ihre langen Erfahrungen, die sie bei der Durchführung des physiol.-chem. Praktikums an der Freien Universität Berlin sammelten, in dieser umfassenden, didaktisch hervorragenden Form, mit vielen sehr klaren Abbildungen und Diagrammen ausgestattet, an alle Interessierten weitergeben.

Es bleibt zu wünschen, daß man sich dort, wo Praktika in der Physiologischen Chemie abgehalten werden, dieses Buches bedient und entsprechend der apparativen Ausstattung eine möglichst vielseitige Auswahl der Versuche trifft.

H. Debuch, Köln

Cross Electrophoresis. Its Principle and Applications. Von S. NAKAMURA. IX, 194 S., zahlr. Abb. und Tab., Dfl. 47,50.

Igaku Shoin Ltd., Tokyo-Elsevier Publishing Comp., Amsterdam-London-New York (1966).

Unter dem Titel: „Ein einfaches elektrophoretische Verfahren zum Nachweis lockerer Additionsverbindungen“ beschrieben W. GRASSMANN und L. HÜBNER 1953 in den Naturwissenschaften (40, 272) die Modifikation einer Elektrophorese-Technik, die von den Autoren des vorliegenden Buches weiter vervollkommen und für zahlreiche biochemische Problemstellungen angewandt wurde. Das als „Cross Electrophoresis“ bezeichnete